优良实验室规范
Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度系统



前言

优良实验室规范 (GLP) 目的是获得准确、高精度的结果，这就需要使用能正确运行、符合全球监管机构如美国药典 (USP) 和欧洲药典 (EP) 要求的测量系统。Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度系统包括一个紫外-可见仪器，其基于行业领先的液相光电二极管阵列检测器技术，设计和制造满足最严格的标准和监管要求。安捷伦提供了全方位的服务计划和法规依从服务套装，帮助您完成 8454 紫外-可见系统和组件的验证，确保最高水平的可靠性和性能。本文着眼于需要验证的特定组件：仪器、软件和验证测试方法，并介绍了 Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度系统设计用于满足初始和反复验证的需求的功能。

分光光度计

该紫外-可见系统基于 Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计。不同于传统的扫描分光光度计，二极管阵列分光光度计（如 Cary 8454 紫外-可见分光光度计）没有具有光学活性的移动部件，同时，30 多年的制造运行也证明二极管阵列分光光度计无论是在短期（几小时或几天）还是长期（几个月或几年），都具有非常好的重复性和稳定性。没有移动部件，意味着不需要机械部件的调整或重新校准，因而验证主要要求：

- 检查仪器是否满足性能指标
- 检查性能的显著变化

性能变化会影响定量分析的准确度，揭示潜在的问题。大多数情况下，性能上的变化是由氘灯的光强在其生命周期里逐步降低所引起的。

验证

Agilent Cary 8454 紫外-可见系统软件拥有内置的自验证功能，从而不需要频繁的全面验证。原则上，只有经过维修或是更换光源后，才需要进行全面的验证程序。当噪音达到不可接受的水平时应更换光源。

然而，依据传统分光光度计常见的做法，我们建议每六个月进行一次全面验证。USP 和 EP 的紫外-可见分光光度计性能验证有明显的区别。USP 规定："仪器的性能应达到制造商所规定的性能"。相反，EP 给出了具体的波长准确度、光度准确度、杂散光以及分辨率的测试方法和性能要求。Agilent Cary 8454 紫外-可见系统满足这两种规定的要求，可以提供一系列的测试，包括 EP 要求的所有测试，并允许用户选择这些测试，根据公司或国家规定的需要进行全面验证。分光光度计性能验证组件的性能指标如下。

性能验证指标

波长准确度

经认证的 NIST 可追溯氧化钬高氯酸盐溶液通过 14 次验证获得的透射峰极小值准确度在 ± 0.5 nm 内[1,2]。仪器使用空气或空白溶液作为空白，并对标准品的透射光谱进行了测量。所测出的波峰极小值随后同给定的波长相比较。

光度计准确度

- 使用 NIST 可追溯的 930e 吸收玻璃标准品，透射率为 10%，在 440.0、465.0、546.1、590.0 和 635.0 nm 处，大约 1 AU 的准确度在 ± 0.005 AU 范围内。仪器使用空气作为空白，并测量了在特定波长处的吸光度值。随后将这些值与标准品的给定值相比较。
- 使用 6% w/v 重铬酸钾 NIST 可追溯 935a 溶液溶解在 0.01 N 硫酸中（也可使用 0.001M 高氯酸），在 235、257、313、350 nm 处的准确度为 ± 0.01 AU。仪器使用了空白，并测量了在特定波长处的吸光度值。随后将这些值与标准品的给定值相比较。

杂散光

- 使用 50 g/L $NaNO_2$ 溶液测得在 340 nm 处小于 0.03%
- 使用 10 g/L NaI 溶液测得 220 nm 处小于 0.05%
- 使用 1.2% KCl 溶液测得 198 nm 处小于 1%

在透射模式下，仪器使用了空气作为空白。透射率值通过使用适合的溶液在合适的波长下测得。

分辨率

0.02% v/v 含甲苯的正己烷溶液在 269 和 266 nm 处的吸光度比值大于 1.5。仪器使用正己烷作为空白，并测量了在特定波长处的吸光度值。比率经过计算，并同给定值进行比较。

噪音

500 nm 处 0 AU 小于 0.0002 AU rms（均方根）。不需要滤光片或标准品。样品区域空白，积分时间为 0.5 秒，在用户指定的波长下进行了 60 次连续的吸光度测量。将测得的数据代入下面的公式计算噪音：

噪音 (rms) = $\sqrt{((\Sigma(X-x)^2)/n)}$

X 是 11 个点的偏移平均值，x 是测量值，n 是测量点数。

基线平直度

0 AU 处小于 0.001 AU rms。不需要滤光片或标准品。测定没有样品时的空白，然后使用 0.5 秒的积分时间测量样品的吸收光谱。基线的均方根值使用上面的公式进行计算，但是使用的是标准平均值。

稳定性

在 0 AU，340 nm 处经过 1 个多小时的测量，波动小于 0.001 AU。不需要滤光片或标准品。

Agilent Cary 8454 紫外-可见验证程序允许用户选择那些符合国家或国际标准的测试，如图 1 所示。系统的验证程序会主动提示用户插入标准品并进行适当的测量。该程序会执行计算并生成验证报告。并且结果可以存档，便于报告和查看。

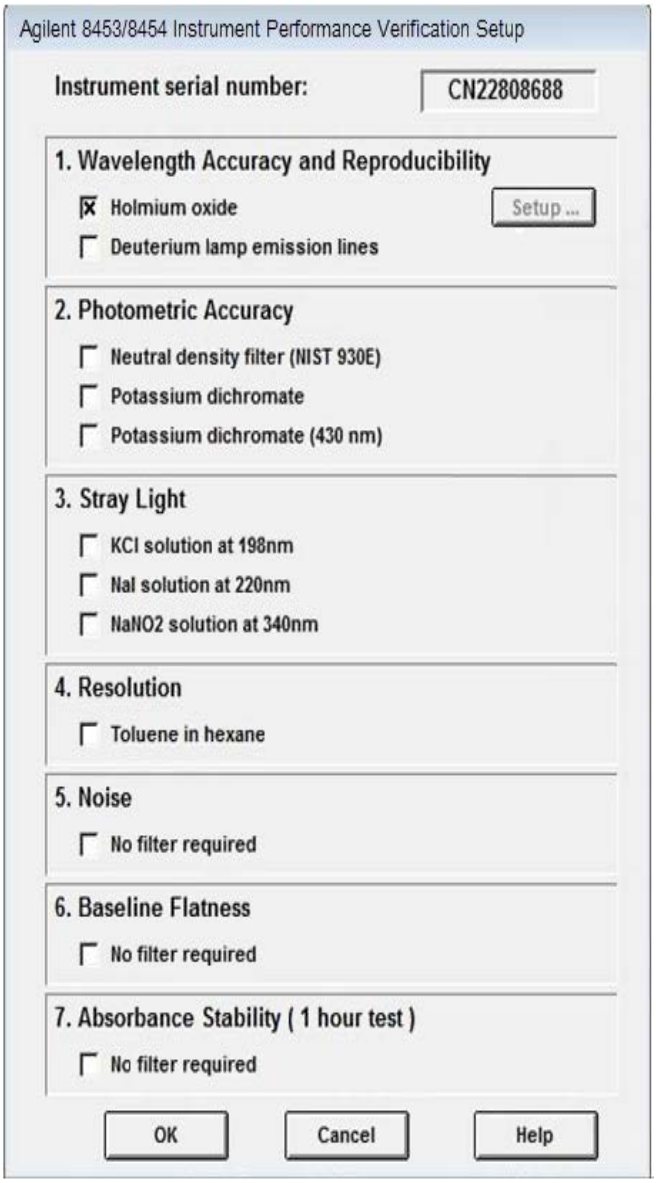


图 1. 用户可选择的验证测试

自检

上述的全面性能验证十分耗时，不适用于日常验证。常见的做法是从每个月到每六个月进行一次全面的性能验证。然而，如果不经常进行全面验证，就需要一些方法来监测各全面验证间的性能。Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计具有内置自检程序，用户可以随时启用。自检包括电子测试（分光光度计启动时还会自动运行）和光学性能测试，将在下文进行归纳。自检能检测到与全面性能验证不同的所有改变。自检结果存储于电子日志中，可随时打印和查看。自检需要每周，甚至每天进行。

分光光度计自检的关键部分：

电子测试：执行电子测试以确保微处理器、内存、通信接口、模拟数字转换器和快门的正确运行。

光学元件：暗电流、强度分布、486.1 和 656.3 nm 处氘灯谱线的波长精确度和分辨率都会进行检查。

计算机和软件

操作软件 ChemStation 可在开发过程中进行了各种验证，如每台仪器随附的验证申明中所述。仪器本身也包含额外的软件程序以支持对电子数据处理特定部件的重新验证。Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计的数据采集会通过如上所述的自动验证程序在后台进行检测。

软件数据分析和报告组件可以使用每份 ChemStation 软件附带的软件验证工具包进行验证。这些验证文件可以用于非 21 CFR Part 11 和 21 CFR Part 11 的软件配置。

工具包包括：

- 用于单组分校准和评价的光谱图
- 用于多组分校准和评价的光谱图
- 设计用于练习光谱处理和定量的方法
- 能自动执行验证过程的自动化文件
- 对预期结果的记录

测试通过加载和运行适当的自动文件进行。软件会自动一步步完成一系列的方法加载、数据加载、数据分析和报告流程，最终生成打印报告，然后再与预期结果对比。用户可以改变验证过程以满足特定需要。Agilent Cary 8454 系统转换的详细介绍请参阅《了解您的 ChemStation》使用手册。这使得用户可以按照审核员的要求，手动重现所有软件计算。

方法验证

方法验证是确认分析方法的性能特性是否适用于相应应用的过程。美国药典 (USP) 记载的验证方法十分详细。

方法验证中需考虑到的分析变量一般包括精度、准确度、检测限、定量限、选择性、线性和耐用性。

用于 Agilent Cary 8454 紫外-可见系统的高级软件包括了能简化分析方法验证的工具。评价分析方法中的变量需要适当的统计工具。高级软件中含有所有结果的完整统计评价。统计方法具有输入标样制备的标准差和由 Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计测量每个样品得到的统计数据的能力。这样的测量统计数据只能使用二极管阵列分光光度计得到。当选择了最大可能性，这些测量的统计数据可以用于校准程序，改善拟合。

- *准确度是指单个测试结果与真实值的接近程度*
  高级软件的波长优化功能可测量方法的准确度。对一个典型的样品在所有测量波长范围内的所有波长进行测量和定量，从而确定能提供最准确结果的波长

- *精度是指对多个同质样品应用同一分析方法而得到的各个测试结果间的一致程度*
  高级软件包括能计算一系列样品分析结果标准差的测试方法。这是对方法精度的直接测量

- *灵敏度是对给定数量分析物响应的程度。灵敏度由两个分析因子表示，分别为检测限和定量限*
  检测限是指仪器设置在最高灵敏度时所能检测到的分析物最低浓度。当分析物所发出的信号等于测量中噪音的三倍时即认为达到了检测限。高级 ChemStation 软件能提供带有基于检测中噪音水平的标准差的定量结果。检测限约等于标准差的三倍

- *定量限是指在可接受的精度和准确度下所能测得的分析物最低浓度*
  可接受的精度和准确度取决于分析目的。有了这些定义，上述工具就可以用来确定可接受的限度

- *线性是指方法生成的测量结果在给定范围内与样品中待分析物浓度成比例的能力，无论是直接成比例还是通过数学转换*
  对于紫外-可见分光测量而言，常用的线性关系是比尔定律 高级 ChemStation 软件能提供关于校准曲线线性的图形化和统计化评价（图 2）。图形显示校准曲线具有 95% 的置信区间。统计值包括每个标样与计算出的关系间的百分误差、相关系数和拟合回归标准差

高级软件的评价标准品功能可优化线性。这个功能可以使用指定的校准参数，在所有波长下使用任何标准品进行校准。每一个波长下校准曲线的质量由对波长作图的相关系数、回归标准差或不确定性表示。在选中的统计数据能提供最优值波长处的校准为最佳校准（图 3）

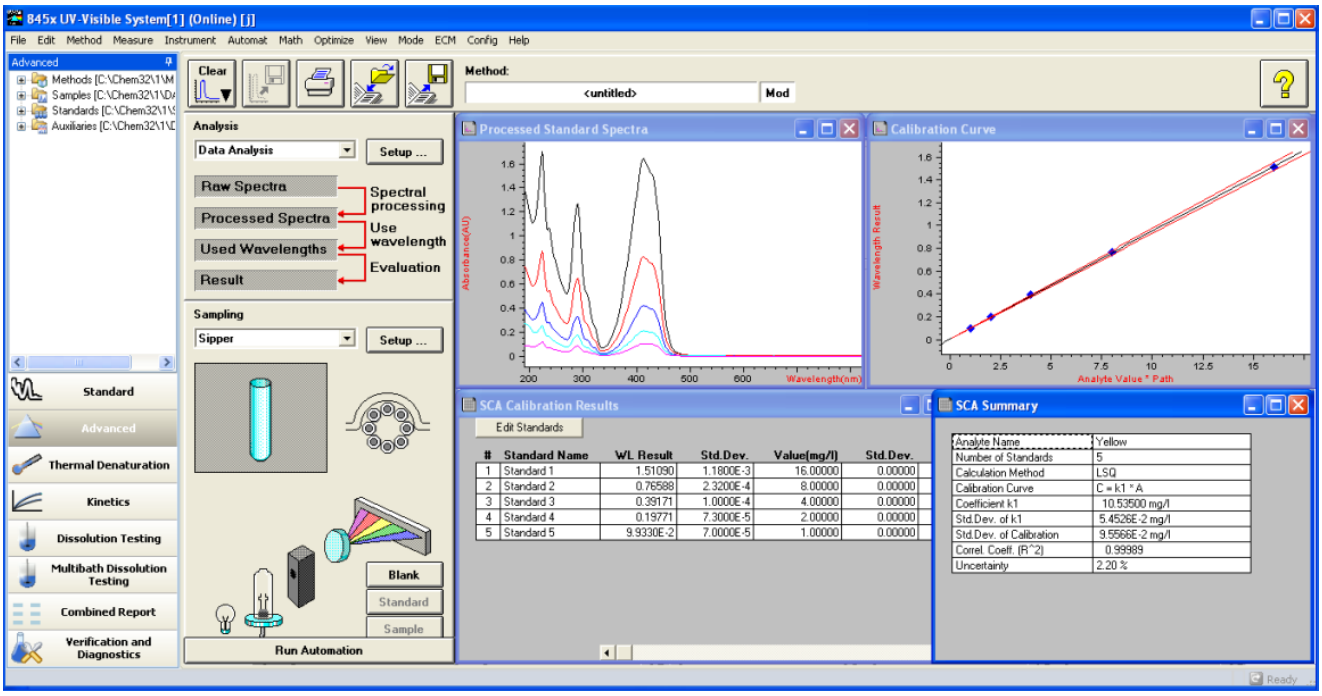


图 2. 计算结果

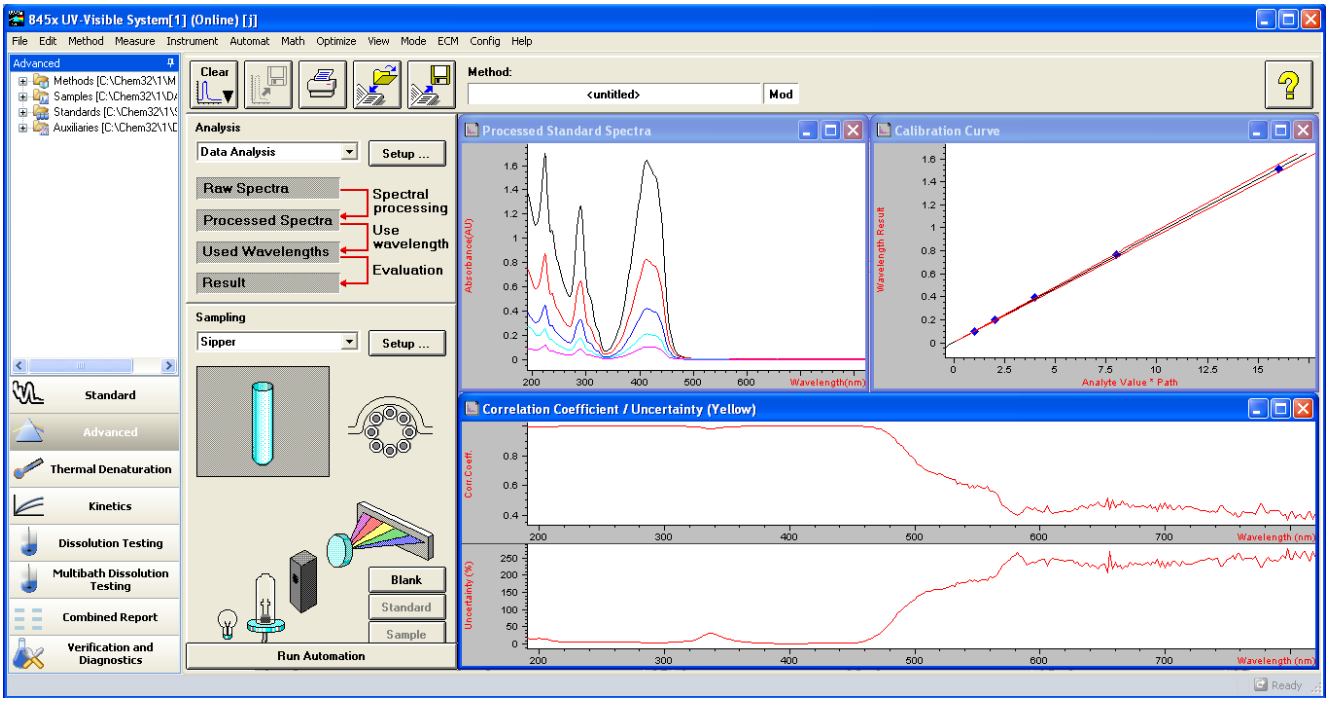


图 3. 高级软件标准品评价功能的结果

- *范围是指满足精度、准确度以及线性要求的分析物水平的上限和下限之间的部分*
  范围可以通过分析含有不同浓度分析物样品得到，并可使用上述工具检测是否达到了要求的精度、准确度和线性

- *选择性是指在其他化合物存在的情况下，方法准确、特异性地定量分析化合物的能力*
  其他化合物可能为存在于样品基质中并能吸收紫外-可见光的前驱体、已知杂质、辅料以及降解产物。高级 ChemStation 软件包括优化波长功能，可用于寻找能够给出目标分析物最佳灵敏度的波长

要使用这一功能，首先需要测量校准标准品，输入所需的分析参数。然后测量出典型样品的光谱图，利用在所有适用波长处计算出的校准系数使用高级软件的优化波长功能对样品进行定量分析，并将结果与波长进行作图（图 4）。

当样品中的分析物浓度已由另一种技术得到时，最接近已知值的结果的波长则为能提供最佳选择性的波长。当分析物的浓度未知时，能提供最低浓度的波长通常具有最高的选择性（杂质通常叠加到吸光中导致结果偏大）。

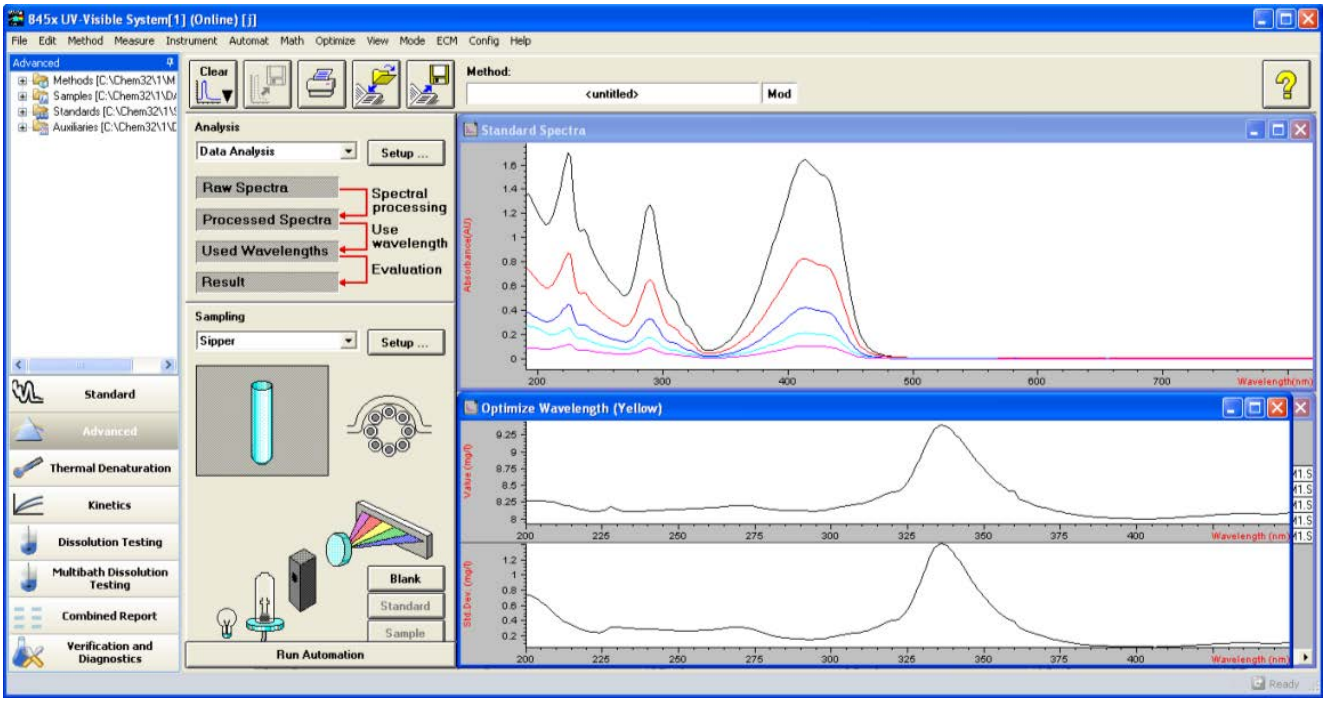


图 4. 高级软件优化波长功能的结果

- *稳定性是在各种测试条件下分析相同样品所获得的测试结果的重复程度*

  方法不应受时间或位置的影响。方法的重现性应该建立在各种条件下，比如不同的试剂批次或是不同的试验温度。测试稳定性应包含多于单个仪器的仪器间和实验室间的测量

记录

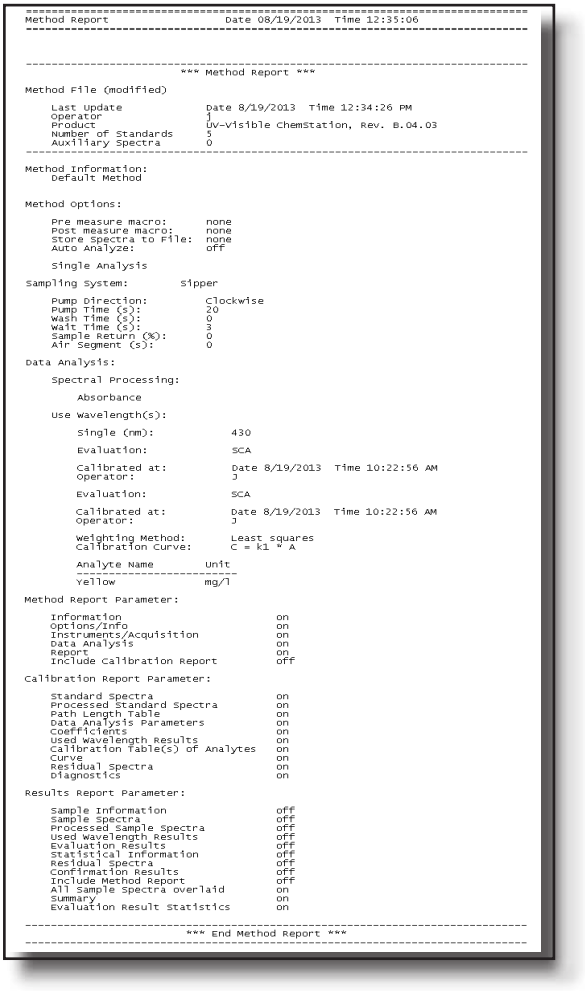
任何验证过程的一个重要组成部分是进行正确的记录。图 5 给出了系统生成的方法记录的例子。该报告提供了特定方法的完整概述，包括所有参数、数据采集、数据分析和报告。如果方法使用校准，可以使用额外记录（参见下文）。

系统适用性

系统适用性不应同方法验证相混淆。系统适用性的目的是评估分析系统的组件，表明系统性能满足方法所要求的标准。

方法验证在方法开发的最后一步实施，而系统适用性测试是在一个给定的系统周期里确定其适合性或有效性。色谱系统的系统适用性要求已经拥有明确的定义，而对于紫外-可见分光光度计，用户则开发了他们自己进行系统适用性检查的策略。例如：

A. 使用一个与预期组分浓度完全相同的标准品进行测量和校准。然后对标准品和稀释两倍的标准品进行测量和定量分析。两个样品的结果应该在已知浓度的一定百分比内。重新对标准品进行测量以获得初始测量的质量。使用一个标准品和两个对照样品（标准品和 50% 标准品），并输入



```
Method Report                    Date 08/19/2013  Time 12:35:06

                          *** Method Report ***

Method File (modified)

     Last Update              Date 8/19/2013  Time 12:34:26 PM
     Operator                 J
     Product                  Uv-visible ChemStation, Rev. B.04.03
     Number of Standards      5
     Auxiliary Spectra        0

Method Information:
     Default Method

Method Options:

     Pre measure macro:       none
     Post measure macro:      none
     Store Spectra to File:   none
     Auto Analyze:            off

     Single Analysis

Sampling System:         Sipper

     Pump Direction:          Clockwise
     Pump Time (s):           20
     Wash Time (s):           0
     Wait Time (s):           3
     Sample Return (%):       0
     Air Segment (s):         0

Data Analysis:

     Spectral Processing:

          Absorbance

     Use Wavelength(s):

          Single (nm):             430

          Evaluation:              SCA

          Calibrated at:           Date 8/19/2013  Time 10:22:56 AM
          Operator:                J

          Evaluation:              SCA

          Calibrated at:           Date 8/19/2013  Time 10:22:56 AM
          Operator:                J

          Weighting Method:        Least squares
          Calibration Curve:       C = k1 * A

          Analyte Name        Unit
          ------------------------
          Yellow              mg/l

Method Report Parameter:

     Information                        on
     Options/Info                       on
     Instruments/Acquisition            on
     Data Analysis                      on
     Report                             on
     Include Calibration Report         off

Calibration Report Parameter:

     Standard Spectra                   on
     Processed Standard Spectra         on
     Path Length Table                  on
     Data Analysis Parameters           on
     Coefficients                       on
     Used Wavelength Results            on
     Calibration Table(s) of Analytes   on
     Curve                              on
     Residual Spectra                   on
     Diagnostics                        on

Results Report Parameter:

     Sample Information                 off
     Sample Spectra                     off
     Processed Sample Spectra           off
     Used Wavelength Results            off
     Evaluation Results                 off
     Statistical Information            off
     Residual Spectra                   off
     Confirmation Results               off
     Include Method Report              off
     All Sample Spectra overlaid        on
     Summary                            on
     Evaluation Result Statistics       on

                          *** End Method Report ***
```

图 5. 方法记录

对照样品可接受的误差，利用 Agilent Cary 8454 紫外-可见系统中的自动化功能，可实现上述策略的自动化执行。如果一个对照结果超出了指定的范围，则会在结果报告中自动标记出来。

B. 测量标准品和一系列的标准品稀释样，计算每一浓度的消光系数（吸光度值/浓度）。消光系数值的变化不应该大于一个指定的百分比。在 Agilent Cary 8454 紫外-可见系统中，其自动化功能可以实现多达 3 个标准品的自动化测量。对于校准，校准结果包括从校准曲线得到的每一个标准样品的百分比偏差。这个百分比误差同每个标准样品消光系数偏差相同。

数据质量

一个适当的验证系统和分析方法并不能确保日常使用中总能产生有效的结果。为了得到有效的结果，操作者必须严格按照操作规程执行。Agilent Cary 8454 紫外-可见系统提供了确保这样做的功能。ChemStation 方法文件将完整的分析确定为全局性方法。它作为单个文件存储，当加载时，可在无操作人员参与的情况下，设置所有的数据采集、数据评价和校准参数，从而消除了出错的机会。

通用性方法和法规适应性

安捷伦拥有两种不同的软件包能满足美国联邦法规 (CFR) 第 21 章第 11 款关于存储和保护电子记录和电子签名应用的规定。

安全包是帮助用户实现 21 CFR Part 11 法规遵从性的工具，作为紫外-可见 ChemStation 的插件提供。为了安全，包含了两种密码保护的操作权限。在管理权限下，可对全局方法进行开发、编辑和存储。而在使用权限下，对于日常测试，可以加载和运行这些全局方法。ChemStation 也可以使用 OpenLAB ECM 功能帮助实现 21 CFR Part 11 法规遵从。认证包插件针对的是需要不同用户组对 ChemStation 方法功能和分析参数进行更灵活访问的工作流程。

标准操作程序

对于一些系统不能控制的程序和动作，需要提供标准操作程序 (SOP)。SOP 是操作者需要遵守以保证程序有效的文档说明。它们可以分为三种类型（表 1）：

- Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计维护
- Agilent Cary 8454 紫外-可见系统验证
- 正确操作

表 1. Agilent Cary 8454 紫外-可见系统 SOP 模板

维护	更换光源
	清洗光源透镜
安装	安装 Agilent Cary 8454 紫外-可见系统
验证	验证 Agilent Cary 8454 分光光度计
	验证通用紫外-可见 ChemStation 软件
	验证高级 ChemStation 软件
	验证生物化学分析软件
操作	使用标准比色皿测量样品光谱
	使用蠕动泵系统测量样品光谱

错误检查

尽管拥有上述措施，错误仍然可能会发生。所以只要有可能，在结果生成时对其质量进行内置的系统检查会大有帮助。这些测试可以标记由于下列错误生成的值：

- 可能测量了错误的样品
- 样品可能被污染
- 测量可能超出了仪器的线性范围

Agilent Cary 8454 紫外-可见系统的一个重要的组成部分是系统的固有功能，或能添加到方法中确保获得的数据质量的功能。

- **没有空白不能测量：**如果 Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计没有提前测量空白，就不能测量样品
- **使错误的数据无效：**Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计可以在 0.1 秒内测得一张谱图，但是经常使用更长的 0.5 或 1 秒的积分时间。这段时间用于对几次光谱测量进行平均，改善信噪比。此外，还需计算测量的标准差。如果在积分时间里发生问题，引起测量变化（比如气泡），标准差将会变得很大。有效的样品在积分时间里不会引起吸光度的明显变化。Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计会将具有较大标准差的所有测量记录为无效，自动消除错误测量
- **统计数据：**Agilent Cary 8454 紫外-可见系统具有多种统计评价工具，内置在从数据采集到数据处理，再到校准和评价的所有阶段。这些统计值是重要的质量工具，表明已做过高精度测量，如表 2 所示

表 2. Cary 8454 系统的质量统计功能

通用紫外-可见 ChemStation
• 单组分校准：校准的标准差、相关系数、每个标样校准曲线的百分误差
高级紫外-可见 ChemStation
• 每次测量的标准差。校准标准品的标准差说明，用于校准的统计评价 • 单组分校准：校准的标准差、相关系数、不确定性、每个标样校准曲线的百分误差、杠杆值、库克距离 • 95% 预测区间单组分定量结果 • 95% 预测区间相对拟合误差多组分分析结果（描述标准品测试光谱拟合质量，标示不正确的样品鉴定或者样品污染物）

- **分析确认：**Agilent Cary 8454 紫外-可见系统可以用多达 4 个独立的数据分析过程评价一个样品。该功能的一个重要应用就是确认分析。这种技术利用波长交叉检查在需要分析波长下得到的结果

  确认分析可以检测和正确识别样品、样品污染物、样品分解产物以及分光光度计线性动态范围之外的测量。不满足确认分析要求的样品会被自动标记出来（图 5）

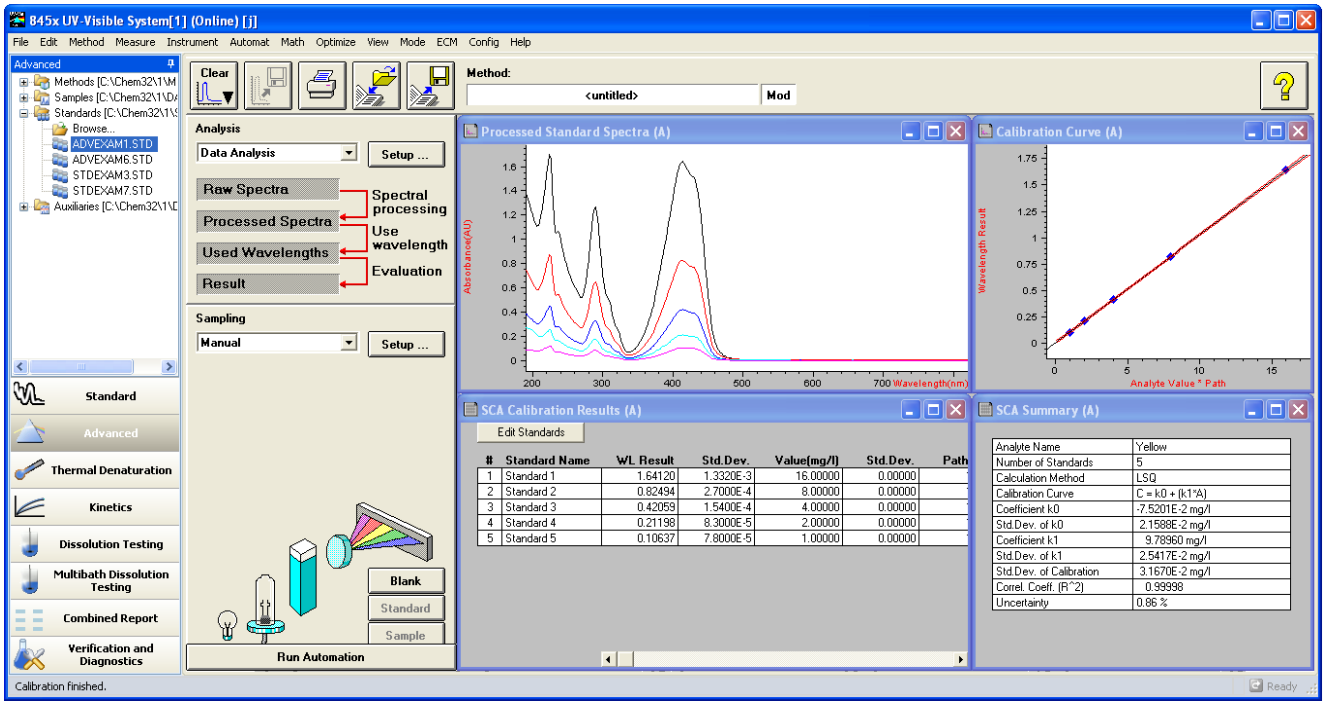


图 5. 确认分析结果（限值 1%）

仪器日志

Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计拥有内部日志。其包含所有的自检结果和仪器报告的错误。用户还可以访问日志，记录仪器验证和仪器进行的所有维修。

生成原始数据的过程以电子档的形式完整记录在了硬盘上。每一台 Agilent Cary 8454 紫外-可见分光光度计的固件中都有一个序列号和固件版本号。每次系统启动时软件都会自动读取数据，并主动识别仪器及其之前进行的测量。关键信息，诸如用户名、时间、日期、分光光度计序列号和其他可用信息（比如帕尔贴温度控制器连接时的温度）都会被自动添加到每次测量的光谱和结果文件中。这些信息可以在屏幕上显示，但是不可编辑。

作为方法的一部分，您可以指定将所有数据的以其被获取时的形式自动存储，确保结果的可追溯性。原始数据会同上述所有的注释信息一起存储。此外，即便只使用一个波长进行分析，也可指定进行全谱采集和存储，这样可以查看样品的完整信息。

数据存储

采用正确的编码和归档，测试数据可以安全地存储很长时间。所有的 Agilent Cary 8454 紫外-可见系统数据和方法文件都以二进制格式储存并且不可编辑。

参考文献

1. Travis et al, Intrinsic Wavelength Standard Absorption Bands in Holmium Oxide Solution for UV-Visible Molecular Absorption Spectrophotometry, *J. Phys Chem. Ref Data* 34, 12 (2005)

2. Wavelength accuracy and reproducibility of the Agilent UV-Vis diode array using holmium oxide（采用氧化钬的安捷伦紫外-可见二极管阵列的波长准确度和可重现性），*安捷伦应用简报* 5991-3446EN (2013)

安捷伦科技（中国）有限公司
www.agilent.com

安捷伦科技（中国）有限公司，2014。
本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

2014 年 3 月 13 日，中国印刷
5991-4282CHCN

The Measure of Confidence

Agilent Technologies